



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 529 300 A1**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: **92112427.7**

⑮ Int. Cl.5: **C07K 15/26, C07K 3/28,
A61K 37/66**

⑭ Anmeldetag: **21.07.92**

⑯ Priorität: **27.08.91 DE 4128319**

⑰ Anmelder: **BIOFERON Biochemische
Substanzen GmbH & Co
Erwin-Rentschler-Strasse 21
W-7958 Laupheim 1(DE)**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.03.93 Patentblatt 93/09

⑱ Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC
NL PT SE**

⑲ Erfinder: **Siklosi, Thomas&NUM;
Alpenweg 15&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)
Erfinder: Joester, Karl-Eduard&NUM;
Bussenweg 5&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)
Erfinder: Hofer, Hans&NUM;
Beim Käppele 11&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)**

⑳ Vertreter: **Schwabe - Sandmair - Marx
Stutzstrasse 16
W-8000 München 80 (DE)**

㉑ **Neues rekombinantes Human-IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung und dieses enthaltende pharmazeutische Zubereitungen.**

㉒ Die Erfindung betrifft ein neues rekombinantes Human-IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung und dieses enthaltende pharmazeutische Zubereitungen. Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta besitzt eine höhere Stabilität als die bisher bekannten IFN-beta-Präparationen sowie eine deutlich verbesserte Antitumorwirkung im Vergleich zu natürlichem IFN-beta. Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta ist durch einen Anteil an biantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 60 %, einen Anteil von triantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 15 % und einen Anteil von tetraantennären Oligosaccharid-Strukturen von 0 bis 5 % sowie einen Sialinsäuregehalt von mindestens 80 % gekennzeichnet. Es enthält weiterhin gegebenenfalls einen Fucoseanteil. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aus einer Kombination von Phasenverteilung-, Affinitäts-, Metalchelat- und Size-Exclusion-Chromatographie besteht, ist es möglich, das erfindungsgemäße Human-IFN-beta reproduzierbar und in hoher Reinheit mit den vorgenannten Eigenschaften herzustellen. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen sind insbesondere zur Behandlung des Kaposi Sarkoms geeignet.

EP 0 529 300 A1

Die Erfindung betrifft ein neues rekombinantes Fibroblasteninterferon, Verfahren zu dessen Herstellung und pharmazeutische Zubereitungen enthaltend dieses rekombinante Human-Interferon-beta (IFN-beta).

Natürlich vorkommende Interferone sind speziesspezifische Proteine, meistens Glykoproteine, die von verschiedenen Zellen nach einer Induktion mit Viren, doppelsträngiger RNA, anderen Polynucleotiden,

5 Antigenen und Mitogenen produziert werden. Die Interferone besitzen zahlreiche biologische Aktivitäten. Die wichtigsten sind die antivirale, antiproliferative, immunmodulierende und die antizelluläre Wirkung. Bei den humanen Interferonen unterscheidet man drei Typen, die in Leukocyten, Lymphocyten, Fibroblasten und innerhalb des Immunsystems produziert werden. Sie werden als alpha-, beta- und gamma-Interferone bezeichnet.

10 Natürliche Human-IFN-beta wird von induzierten Humanfibroblasten-Zellkulturen produziert und aus dem Zellkulturüberstand isoliert und gereinigt. Proteine oder Polypeptide mit Human-IFN-beta-Aktivität können auch unter Verwendung der rekombinanten DNA-Technik in Mikroorganismen oder eukaryotischen Zellsystemen, wie z. B. Säuerzellkulturen, produziert werden, vgl. William E. Stewart II, The Interferon System, 2. Ausgabe, Springer-Verlag Wien, New York (1981); EP-A 41 313; W. Reiser und H. Hauser, 15 Arzneim. Forsch./Drug. Res. 37 (1), Hr. 4 (1987), Seite 482; Mc Cormac et al., Molecular and Cellular Biology, Vol. 4, No. 1, Seite 166 (1984).

Natürliche und rekombinante Interferone wurden bisher mit mehr oder weniger großem Erfolg zur Behandlung von Patienten mit Tumor-, Virus- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Mit verschiedenen alpha-Interferonen wurde ein Tumor-Response von 20 bis 40 % von Patienten im Frühstadium des mit AIDS verbundenen Kaposi-Sarkoms beobachtet. Nachteilig bei der Behandlung mit alpha-Interferon ist jedoch die hämatologische Intoleranz und hepatische Komplikationen, die die einsetzbare Dosis limitieren. Ein weiterer Nachteil bei der IFN-alpha-Behandlung und gleichzeitiger Verabreichung von Azidothymidin liegt darin, daß beide Substanzen eine hohe hämatologische Toxizität besitzen, so daß eine gemeinsame Verabreichung mit nicht tolerablen Nebenwirkungen verbunden ist und damit ausscheidet; vgl. Annals of Internal Medicine, 25 Vol. 112, No. 3, 582 (1990).

30 Fibroblasten-Interferon (IFN-beta) besitzt viele immunologische Eigenschaften, die mit denen des IFN-alpha vergleichbar sind. Jedoch wird IFN-beta wesentlich besser toleriert und besitzt offensichtlich auch eine geringere hämatologische Toxizität als IFN-alpha in den bisher untersuchten Fällen von Nierenzellkarzinom und lymphoiden Tumoren. In in vitro Untersuchungen inhibiert IFN-beta das HIV-Virus und zeigt eine synergistische antiretrovirale Aktivität mit Azidothymidin.

35 Da bei längerer Verabreichung von Azidothymidin allein eine Resistenz entwickelt wird, wäre es von großem Vorteil, über Substanzen wie IFN-beta zu verfügen, die sich im Idealfall hinsichtlich der antiretroviro-ralen Aktivität, des Wirkmechanismus und des Toxizitätsprofils von Azidothymidin unterscheiden.

Ein weiterer Nachteil der Interferone, insbesondere auch der rekombinanten, ist ihre Instabilität. 40 Insbesondere die hochreinen Interferonpräparate für die klinische Anwendung zeigen sowohl im flüssigen als auch im lyophilisierten Zustand einen raschen Aktivitätsverlust. Für Interferone, die mittels der rekombinanten DNA-Technologie in Bakterien hergestellt werden, besteht ein weiterer Nachteil darin, daß auf diese Art produzierte Interferone in wässrigen Lösungen nahezu unlöslich sind.

Aus dem Stand der Technik sind zahlreiche Vorschläge zur Überwindung dieser Nachteile bekannt, 45 wobei die meisten dieser Verfahren den Zusatz verschiedenster chemischer Verbindungen zur Interferonpräparation vorschlagen, um die Löslichkeits- und/oder Stabilitätsprobleme zu beseitigen.

Alle derartige Verfahren besitzen jedoch nach wie vor die Nachteile, daß sie bei der Herstellung der Interferonpräparation einen zusätzlichen Arbeitsschritt erfordern, daß die Stabilität weiterhin nicht befriedigend ist und daß viele der Zusätze medizinisch nicht zulässig sind, weil sie entweder bekanntermaßen 50 toxische Wirkungen besitzen oder weil ihre Toxikologie bislang ungeklärt ist, so daß derartige Zusätze von vornherein für eine klinische Verwendung ausscheiden; vgl. EP-A 270 799, EP-A 89 245, EP-A 217 645, EP-A 215 658, WO 89/05158, WO 89/02750, EP-A 82 481, EP-A 80 879, US-PS 44 83 849 und WO 90/03784.

Die Anmelderin hat nun überraschend gefunden, daß mit einem IFN-beta, dessen Herstellung im 55 folgenden beschrieben wird, nicht nur eine unerwartet verbesserte Antitumorwirkung erzielbar ist, sondern auch stabilere flüssige oder feste (lyophilisierte) Zubereitungen als die im Stand der Technik bekannten, hergestellt werden können.

Erfindungsgemäß werden daher ein neues rekombinantes IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung sowie stabile pharmazeutische Zubereitungen von IFN-beta in flüssiger oder lyophilisierter bzw. fester Form 60 zur Verfügung gestellt, die hochreines rekombinantes IFN-beta in hohen Dosen ohne irgendwelche pharmakologisch nachteiligen Zusätze enthalten. Das erfindungsgemäße IFN-beta besitzt eine höhere Antitumorwirkung, insbesondere beim Kaposi-Sarkom, als die bislang getesteten IFN-beta-Präparationen von natürlichen oder rekombinantern IFN-beta.

Erfindungsgemäß wird das neue IFN-beta mittels der rekombinanten DNA-Technik in Säugerzellkulturen produziert und durch ein Verfahren, das aus einer Kombination von Phasenverteilung-, Affinitäts-, Metallchelat- und Size-Exclusion-Chromatographie besteht, hergestellt. Die einzelnen Schritte können auch in einer anderen Reihenfolge, wie z. B. Phasensystem-, Metallchelat-, Affinitäts- und Size-Exclusion-Chromatographie, ausgeführt werden oder in jeder beliebigen Reihenfolge wiederholt werden, wobei die Phasenverteilung als erster Schritt obligatorisch ist.

5 Das durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellte rekombinante humane IFN-beta ist somit gekennzeichnet durch:

- 10 (a) ein bestimmtes Glykosylierungsmuster;
- (b) eine hohe Volumenaktivität von $> 40 \times 10^6$ IU/ml;
- (c) hohe Eigenstabilität;
- (d) höhere klinische Wirksamkeit, insbesondere eine höhere Antitumorwirkung.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen IFN-beta werden bevorzugt transfizierte Zellen der CHO-Linie (chinese hamster ovary) mit der Laborbezeichnung BIC 8622 (Konstruktion der animalen Zelllinie, vgl. 15 Europäische Patentanmeldung Nr. 0 287 075), in üblichem Zellkulturmedium (Modified Eagles Medium (MEM) mit Earles Salzen), supplementiert mit 0 bis 5 % fötalem Kälberserum (FCS), in stationärer Kultur zur Konfluenz gebracht. Die Zellen sezernieren konstitutiv zwischen 1×10^8 und 2×10^9 Internationale Einheiten (IU) pro Tag und pro Liter Kulturüberstand.

20 Erfindungsgemäß wird das IFN-beta weiter über flüssig/flüssig Phasenextraktion angereichert, wobei wäßrige Zweiphasensysteme auf der Basis Polyalkylenglykol/Dextran oder Polyalkylenglykol/Salz zum Einsatz kommen.

Bei den Polyalkylenglykolen können Polyethylenglykole und/oder Polypropylenglykole eingesetzt werden. Als Polyethylenglykole können Polyethylenglykole mit einem MW von 1.000 bis 6.000, bevorzugt 1.200 bis 3.000, am meisten bevorzugt 1.500 bis 2.000 verwendet werden. Die Konzentration liegt im 25 Bereich von 1 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 2 bis 15 Gew.-%, am meisten bevorzugt 3 bis 9 Gew.-%. Als Polypropylenglykole können Polypropylenglykole mit einem MW von 1.500 bis 4.000 verwendet werden. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen denen für die Polyethylenglykole. Als Dextran können Dextrane mit einem Molekulargewicht von 15.000 bis 5.000.000, bevorzugt 100.000 bis 1.000.000, am meisten bevorzugt 350.000 bis 550.000 verwendet werden. Die Konzentration liegt im Bereich von 1 bis 10 30 Gew.-%, bevorzugt 2 bis 6 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von 4 bis 6 Gew.-%.

Als Salze können NaCl, LiCl, NaJ, KJ, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, K₂SO₄, NaH₂PO₄, KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, Na-Citrat und Na-Oxalat allein oder in Mischung verwendet werden. Die Konzentration des Salzes liegt im Bereich von 2 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 3 bis 20 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von 4 bis 16 Gew.-%.

35 Das IFN-beta enthaltende Zellkulturmäßiges wird zusammen mit den Bestandteilen der beschriebenen wäßrigen Phasensysteme intensiv für 5 bis 24 h, bevorzugt 8 bis 16 h, am meisten bevorzugt 10 bis 12 h bei 4 bis 25 °C, bevorzugt 10 bis 20 °C, am meisten bevorzugt 13 bis 18 °C gerührt und nach der Entmischung und Abtrennung in der Polyalkylenglykol-haltigen Oberphase angereichert.

40 Die Trennung der wäßrigen Phasen geschieht durch Gravitation oder durch Separation. Die Polyalkylenglykol-haltige Oberphase enthält rekombinantes IFN-beta in einer Konzentration von 1×10^8 bis 1×10^{10} IU/Liter. Die spezifische Aktivität beträgt 5×10^5 bis 3×10^7 IU/mg Protein. Die Ausbeuten liegen nahezu bei 100 %.

45 Für die sich anschließende Affinitätschromatographie wird Blau-Dextran-Sepharose^R, oder andere geeignete mit Cibacron^R Blau immobilisierte Matrices wie Matrix Gel Blue A von Amicon oder Fraktogel TSK AF-Blue von Merck oder Blue-Sepharose^R 6FF von Pharmacia, verwendet.

50 Die aus dem Phasensystem stammende Oberphase wird mit NaCl auf eine Konzentration zwischen 0,5 und 1,0 mol/l gebracht und mit einer Flußrate von 1 bis 5 cm/min auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach Waschung mit PBS, pH 7, oder PBS, enthaltend 1 bis 30 Gew.-% Ethylenglykol und/oder 1 bis 15 % Propylenglykol, wird anschließend mit PBS, enthaltend 10 bis 70 Gew.-% Ethylenglykol und/oder 20 bis 50 Gew.-% Propylenglykol, eluiert.

Nach diesem Schritt weist das rekombinante IFN-beta eine Konzentration von 6×10^6 bis 9×10^7 IU/ml Eluat und eine spezifische Aktivität von 50×10^6 bis 140×10^6 IU/mg Protein auf. Die Ausbeuten liegen zwischen 70 und 90 %.

55 Für die Metallchelatchromatographie sind verschiedene Matrices mit chemisch identischen oder unterschiedlichen Liganden geeignet. Die zur koordinativen Bindung von rekombinantern IFN-beta geeigneten Metallionen können Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ oder Ni²⁺ Ionen sein. Die Desorption kann mittels kompetitiver Substanzen wie Imidazol, Histidin, Glycin oder NH₄Cl, Chelatbildner wie EDTA, IDA (Iminodiessigsäure), TED (Tris-Carboxymethyléthylendiamin) oder durch Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 2 bis pH 4